

N-12

## ルテオリンの *in vitro* および *in vivo* モデル系に対する神経保護・抗不安作用 Neuroprotective or anxiolytic-like effects of luteolin on anxiety-like model both *in vitro* and *in vivo*

○土屋 早<sup>1</sup>, 浮谷基彦<sup>1</sup>, 深津 誠<sup>1</sup>, 加藤守正<sup>2</sup>, 仁科淳良<sup>1</sup>\*Saki Tsuchiya<sup>1</sup>, Motohiko Ukiya<sup>1</sup>, Makoto Fukatsu<sup>1</sup>, Morimasa Kato<sup>2</sup>, Atsuyoshi Nishina<sup>1</sup>

Abstract: In our previous study, neurotogenic activities of the foods extracts of the Yamagata specialty were evaluated in the model system using rat pheochromocytoma PC12 cells. As the results, it was confirmed that compounds from *Dendranthema × grandiflorum* cv. "Mottenohoka" induced neural differentiation of PC12 cells. Furthermore, two neurotrophic compounds were isolated from "Mottenohoka" by chromatography and identified as luteolin and acacetin by mass spectrometry and NMR. In this study, anxiolytic-like effects of luteolin on corticosterone-induced cytotoxicity or stress-induced model mice were evaluated and the effect of luteolin from "Mottenohoka" on anxiety was clarified.

### 1. 目的

日本の山形県は東北地方で特異的に一定人口当たりの自殺者数が少ないことが知られている。我々は、山形県特有の食材中に抗抑うつ成分があると予想し、PC12 細胞を用いたモデル系で山形県特産の食材抽出物の作用を評価した。結果、食用菊「モッテノホカ」が PC12 細胞の神経分化を促進することを明らかにした[1]。さらに、クロマトグラフィーを用いて「モッテノホカ」中の神経分化誘導物質を単離し、質量分析、NMR 等で化学構造を特定した結果、フラボノイド類縁体のルテオリンとアカセチンが神経分化誘導物質であることが分かった。本研究では、PC12 細胞をコルチコステロンで刺激する *in vitro* 抑うつモデル[2]に対するルテオリンの作用とルテオリンを投与した不安モデルマウスの行動パターンを測定し、ルテオリンの抗抑うつ作用の把握を目的とした。

### 2. 方法

- 山形県で購入したモッテノホカのメタノール抽出物を原料として、クロマトグラフィーで純度 90% 以上のルテオリンを調製した。
- PC12 細胞は DMEM (馬血清 10%, 牛胎児血清 5%) を用いて、CO<sub>2</sub> 5%, 37 °C で培養した。
- 細胞毒性は MTT 法で細胞の生存率を測定して求めた。
- アポトーシス関連タンパク質は、細胞ライセートを SDS ページで分離し、タンパク質を PVDF 膜にブロットした後、免疫染色により cleaved caspase-3, -8, 9, Bcl-2, Bax, Akt そして  $\beta$ -actin を検出した。
- *in vitro* の抗不安モデルとして PC12 細胞の培地にコルチコステロンを添加し、細胞の生存率を比較する方法を用いた。
- *in vivo* の抑うつまたは不安モデル実験は次の方法で行った[3]。まず、雄の ICR マウス 7 週齢 (30~31 g) に 15 分間の強制水泳の 2 日後に継続的な軽度ストレス負荷 (20 度の傾斜ケージ 2 日間, 湿床 1 日間, ケージ回転 1 日間) を 3 回繰り返してストレスモデルマウスを作製した。次に、ストレスモデルマウスにルテオリンを投与し、尾懸垂試験 (抗抑うつ) と高架十字迷路試験 (抗不安) でルテオリンの作用を評価した。

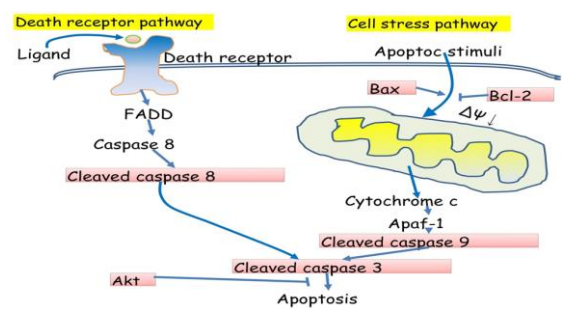


Figure 1: Apoptosis pathway

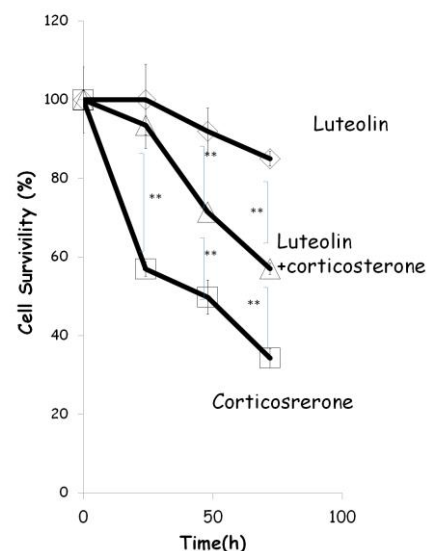


Figure 2: Antiapoptotic effect of luteolin on corticosterone-treated PC12 cells

### 3. 結果

#### ・ *in vitro* 試験

PC12 細胞の培地に 100  $\mu$ M のコルチコステロンを添加する不安モデルで、時間依存的な細胞死が誘導された。細胞死に伴い、Caspase-3、-8、-9 の活性化と Bax の増加、Bcl-2 の減少が観測され、コルチコステロンにより PC12 細胞にアポトーシスが誘導されると判断した。一方、ルテオリンによる前処理 (25  $\mu$ M, 24 時間) によりコルチコステロンによる PC12 細胞のアポトーシスが有意に抑制された。また、ルテオリンはコルチコステロンが誘導する、Caspase-3、-8 の活性化と Bax の増加を抑制した。

#### ・ *in vivo* 試験

尾懸垂時の不動時間は A 群 (ルテオリン摂取・ストレス飼育) では 175.3 $\pm$ 20.5 秒, B 群 (ルテオリン摂取・通常飼育) では 191.0 $\pm$ 11.5 秒, C 群 (通常飼料摂取・ストレス飼育) では 204.4 $\pm$ 19.0 秒, D 群 (通常飼料摂取・通常飼育) では 170.5 $\pm$ 15.6 秒であった。各群を統計的に比較した結果、ルテオリン摂取・ストレス飼育群に有意な尾懸垂時不動時間の減少が認められた。

高架式十字迷路テスト時のオープンアーム滞在時間は、A 群では 65.2 $\pm$ 24.7 秒, B 群では 28.9 $\pm$ 9.1 秒, C 群では 48.4 $\pm$ 10.5 秒, D 群では 41.2 $\pm$ 16.9 秒であった。各群に統計的差異は認められないものの、ルテオリン摂取・ストレス飼育群のオープンアーム滞在時間が長くなる傾向が認められた。

上記の結果から、食用菊「モッテノホカ」が含有するルテオリンが抗抑うつ作用を示す手がかりがつかめた。ルテオリンは植物中に存在する主要なフラボノイドの一つで、顕著な毒性も知られていないので、不安や抑うつに対応する食品成分として実用化される可能性が大きい。

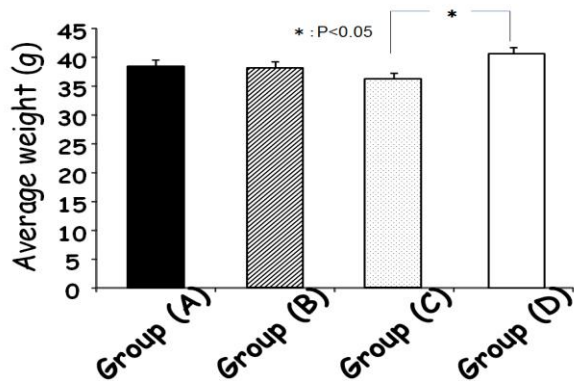


Figure 4: Average weight of mice

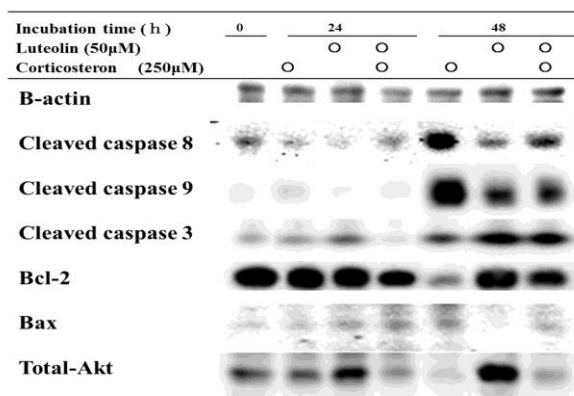


Figure 3: Effects of luteolin on apoptosis-related proteins in corticosterone-treated PC12 cells

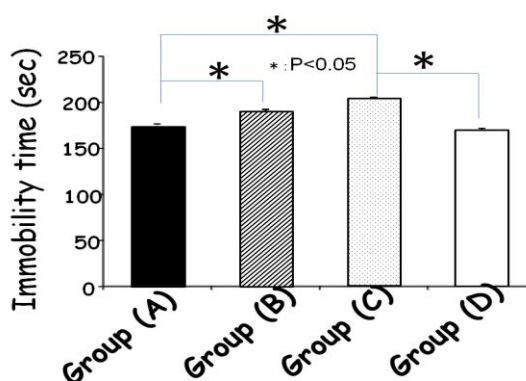


Figure 5: Immobility time in the tail suspension test

### 4. 参考文献

- [1] A. Nishina, H. Kimura, H. Tsukagoshi, K. Kozawa, M. Koketsu, M. Ninomiya, S. Furukawa, Neurite Outgrowth in PC12 Cells Stimulated by Components from *Dendranthema x grandiflorum* cv. "Mottenohoka" Is Enhanced by Suppressing Phosphorylation of p38MAPK, *Evid Based Complement Alternat Med* 2013 (2013) 403503.
- [2] A. Makino, M. Iinuma, H. Fukumitsu, H. Soumiya, Y. Furukawa, S. Furukawa, Anxiolytic-like effect of trans-2-decenoic acid ethyl ester in stress-induced anxiety-like model mice, *Biomed Res* 34 (2013) 259-267.
- [3] Z.Y. Li, Z. Guo, Y.M. Liu, X.M. Liu, Q. Chang, Y.H. Liao, R.L. Pan, Neuroprotective effects of total saikosaponins of *Bupleurum yinchowense* on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells, *J Ethnopharmacol* 148 (2013) 794-803.